

بسمه تعالی

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی قزوین



معاونت پژوهشی

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی پزشکی

عنوان:

بیان و تخلیص ناحیه کینازی پروتئین جهش یافته نو ترکیب FGFR2b و بررسی تغییرات ساختاری آن بر اثر برهمکنش آن با اسیدهای چرب غیر اشباع

نگارنده: معصومه مقدسی

اساتید راهنما: دکتر نعمت اله غیبی، دکتر داریوش ایلغاری

استاد مشاور: دکتر مجید سیرتی ثابت

محل اجرا: دانشگاه علوم پزشکی قزوین

سال تحصیلی ۹۱-۹۲

چکیده

زمینه: گیرنده عامل رشد فیبروبلاستی 2b (FGFR2b) در مسیر پیام‌رسانی سلولی و تنظیم فرایندهای مهم زیستی از جمله تکثیر و تمایز سلولی نقش اساسی دارد. به علاوه تغییرات ژنتیکی نظیر جهش نقطه‌ای در ناحیه تیروزین کینازی FGFR2b با سرطان پستان، تخمدان و رحم در ارتباط است. هم‌چنین مطالعه‌های اپیدمیولوژیکی و مدل‌های حیوانی و سلولی نشان داده‌اند که اسیدهای چرب غیراشباع؛ از جمله اولئیک اسید، لینولئیک اسید و آلفا لینولئیک اسید روی رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی تأثیر دارند.

هدف: این مطالعه به منظور بیان و خالص‌سازی مقدار مناسبی از ناحیه کینازی FGFR2b انسانی و بررسی تغییرات ساختاری آن در برهمکنش با اسیدهای چرب غیر اشباع انجام شد.

مواد و روش‌ها: پلاسمید pLEICS-01 که حاوی ژن ناحیه تیروزین کینازی پروتئین نوترکب FGFR2b بود به باکتری مستعد ایشریشیا کلی BL21 جهت بیان ژن مورد نظر انتقال داده شد. بیان پروتئین نوترکب با استفاده از IPTG یک میلی‌مولار القا شد و با استفاده از الکتروفورز روی ژل پلی‌آکریل آمید در حضور SDS (SDS-PAGE) ارزیابی شد. پروتئین بیان شده با استفاده از کروماتوگرافی میل ترکیبی توسط ستون حاوی Ni^{2+} -NTA خالص شد. فعال بودن نمونه پروتئین بعد از دیالیز توسط تعامل با ناحیه SH2 فسفولیپاز C (PLC) طبیعی و موتان توسط روش PAGE بررسی شد. طیف فلوروسانس و دورنگ نمایی حلقوی و دنا تورا سیون شیمیایی پروتئین خالص شده در حضور غلظت‌های مختلف اولئیک اسید، لینولئیک اسید و آلفا لینولئیک اسید سنجیده شد.

یافته‌ها: بررسی SDS-PAGE قبل و بعد از القا شدن نشان داد که پروتئین بیان شده در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد محلول است. هم‌چنین بررسی SDS-PAGE تأیید کرد که پروتئین خالص شده عاری از آلودگی بود و پروتئین‌های باکتریایی نداشت. نتایج PAGE فعال بودن پروتئین خالص شده را تأیید کرد. بررسی طیف سنجی فلوروسانس افزایش شدت نشر را با افزایش تدریجی غلظت هر سه اسید چرب غیر اشباع نشان داد. طیف سنجی دورنگ نمایی حلقوی نشان داد ناحیه ی کینازی مورد مطالعه ما دارای ترکیب بتای بیشتری نسبت به آلفا می باشد. و نیز حضور اسیدهای چرب در محلول ساختار دوم کیناز را تغییر نمی دهد. دنا تورا سیون شیمیایی ساختار سوم یکی از دومین‌های ناحیه ی کینازی در حضور ALA و OA تغییر داد. هر چند این تغییر در حضور LA مشاهده نشد.

بحث و نتیجه‌گیری: باتوجه به یافته‌ها، ناحیه کینازی گیرنده نوترکب عامل رشد فیبروبلاستی 2b که یک پروتئین ۳۸ کیلودالتونی است تولید و خالص گردید و نشان داده شد که به صورت محلول و فعال است. تغییرات ساختار سوم دومین کینازی موجب ناپایدار شدن آن در حضور ALA و OA گردید. این ناپایداری در سطح مولکولی می‌تواند موجب اختلال در مسیر پیام‌رسانی سلول شود این مطالعات هم جهت است با مطالعات قبلی که استفاده از اسیدهای چرب غیر اشباع را در سرطان به عنوان یک درمان جانبی پیشنهاد می‌کنند.

کلیدواژه‌ها: عامل رشد فیبروبلاست، بیان پروتئین، خالص‌سازی پروتئین، ناحیه کینازی، اسیدهای چرب غیر اشباع، طیف سنجی فلوروسانس، طیف سنجی دورنگ نمایی حلقوی